

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.*A61K 31/426* (2006.01)*A61K 31/155* (2006.01)**(11) 공개번호****10-2006-0049858****(43) 공개일자****2006년05월19일**

(21) 출원번호 10-2005-0060425

(22) 출원일자 2005년07월05일

(30) 우선권주장 1020040052069 2004년07월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인 동화약품공업주식회사
서울 중구 순화동 5번지(72) 발명자 이진수
경기도 용인시 풍덕천1동 693 삼성1차아파트 104동 801호
구세광
경기도 수원시 장안구 화서1동 220-4 영광아파트 1-1005
이정우
경기도 의왕시 내손동 755-2 미원파크빌 201-610
양희복
경기도 군포시 당동 885 주공아파트 4단지 404-801
유제만
경기도 안양시 동안구 부흥동 1103번지 은하수아파트 207-101(74) 대리인 손민
허은순

심사청구 : 있음

(54) 골절 치료용 약제학적 조성물**요약**

본 발명은 골절 치료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘, 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 골절 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 가골의 체적을 유의성 있게 감소시키고, 가골의 골밀도 및 골강도를 유의성 있게 증가시키며, 가골 조직내 결합조직 및 연골조직의 함량을 유의성 있게 감소시키고, 골조직 함량을 유의성 있게 증가시킴으로, 골절시 형성된 가골의 소실 및 가골의 골화를 촉진시킨다. 따라서, 본 발명의 조성물은 골절에 대한 치유 촉진제로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도

도 1

색인어

골절, 벤즈아미딘

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 골절 유발한 후 적출한 8번째 늑골의 조직 절편을 마손스 트리크롬 (Masson's trichrome) 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰한 도이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 골절 치료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘, 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 골절 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

골절은 뼈나 골단판 또는 관절면의 연속성이 비정상적으로 끊어진 상태로, 뼈의 깨짐을 일컫는다. 골절을 유발하는 원인으로는 교통사고 등의 외상, 산업장애에서 일어나는 안전사고, 골다공증, 골암, 대사이상증 등의 질병으로 인한 뼈의 변화 및 스포츠나 하중으로 인한 반복적인 뼈에 대한 스트레스 등이 있다. 또한, 골절 상태는 골절선(골 절단에 의해 발생된 뼈끝단을 따른 선)에 근거하여, 균열골절, 그린스틱(greenstick) 골절, 횡상 골절, 사상 골절, 나선상 골절, 분절골절, 분쇄골절, 견열골절, 압박골절, 함몰골절 등으로 분류된다.

골절이 일어나면 혈관의 손상으로 부분적 출혈과 혈병이 형성되며 골절된 인접부위에 있는 뼈기질은 파괴되고 뼈세포도 죽게된다. 따라서, 골절치유 과정동안 혈병, 손상 받은 뼈세포 및 뼈기질은 큰포식세포에 의해 제거되며, 골절부위 주위에 있는 골막(perilsteum)과 골내막(endosteum)의 뼈선조세포(osteoprogenitor cell)는 활발하게 증식하여 골절 주변에 세포성 조직(cellular tissue)을 형성하고 이들은 골절된 부위로 들어간다. 골절된 부위의 결합조직에서는 작은 연골조각으로부터 연골내 골화과정이 일어나거나 막성뼈 발생과정(intramembranous ossification)을 통해 미성숙한 뼈(immature bone)가 형성된다. 따라서, 골절부위에서는 연골조직, 막성뼈 발생과정 및 연골내 골화 과정이 동시에 관찰된다. 이와 같은 방식에 의해 불규칙하게 형성된 미성숙뼈의 지주(trabecular)가 골절된 뼈의 양끝을 일시적으로 결합시켜 가골(bony callus)을 형성하고, 골절부위에 형성된 가골의 일차뼈조직(woven bone)은 치유가 진행됨에 따라 점차적으로 흡수되어 층판뼈(lamellar bone)로 대체되면서 원래의 뼈구조로 복구된다.

일반적으로 골절 치료 과정은 크게 염증기, 수복기 및 리모델링기로 분류된다.

첫째, 염증기는 골 주변의 조직이 손상되고, 골절 간극에 혈종이 차게되어, 골절 부위에 염증이 발생된다.

둘째, 수복기는 골절 간극 내에서 혈종이 제거되어 육아(granulation) 조직으로 되고, 연가골(soft callus)이 형성되며, 점진적으로 골 형성 메카니즘에 의해 경가골로 치환되는 과정(연골내 골화), 및 골막에 존재하는 골 형성 세포에 의해 새로운 골이 형성되는 과정(섬유성/막 내 골화)인 2개의 과정이 병행하여 진행된다.

셋째, 리모델링기는 형성된 새로운 골이 골 흡수 및 골 형성의 반복에 의해 장기간에 걸쳐 신장되는 한편, 골 변형이 교정되고, 골 결합 부위가 보강된다.

리모델링기 동안 형성된 새로운 골은 일정 정도의 강도를 가져, 일상생활이 덜 제한받게 되지만, 수복기는 오랜 기간이 걸려, 환자의 일상생활을 크게 제한한다. 따라서, 수복기 기간을 단축하는 것이 임상적으로 중요하며, 골절 치료제는 이러한 복잡한 과정을 촉진시켜 완전한 뼈로의 재생을 촉진시키는 것이 중요하다.

골절 치료를 촉진하는 성분으로서, 골 형성단백질(BMP), 변형 성장인자(TGF)와 같은 펩티드형의 생리학적 활성 성분이 있다(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 87, pp. 2220-2224 (1989)). 또한, 포스포디에스테라제(PDE) 저해제를 사용하여 세포내 환형 AMP(cAMP) 수준을 증가시킴으로써 골 질량을 향상시키는 가능성이 연구되었으며, 일반적인 PDE 저해제인 펜톡시필린, 또는 선택적인 PDE4 저해제인 롤리프람을 매일 피하주사 받은 마우스에서 척추 및 대퇴골의 골 무기질 밀도의 증가 및 골질 뼈(cortical bone)의 과다형성이 관찰된다는 것이 보고되었다(Bone, vol. 27., 6 판, pp. 811-817 (2000)).

이와 같이 골 조직의 형성과 골절치유에 관하여 오래전부터 관심의 대상이 되어왔으며, 골절치유 과정을 규명하기 위하여 유전적 요인, 성장기에 따른 영향, 혈액공급에 의한 영향, 고정 방법에 따른 영향, 골 이식 여부, 기타 치유 촉진인자 투여 등의 여러 가지 관점에서 많은 연구가 진행되어 왔다(Kawamura, M and Urist MR., Clin. Orthop., 236, 240-248, 1988).

한편, 골절의 치료에는 상당한 기간이 걸리고, 인구 고령화에 따라 병적 골절의 하나인 골다공증 환자의 골절이 현저히 증가되고 있어, 현재 골다공증 치료제로 사용되고 있는 칼슘과 에스트로겐, 칼시토닌, 활성형 비타민 D, 비스포스포네이트 제제 등을 골절 치료에 사용하여 골절 치료효과를 기대하였으나, 골밀도 감소를 억제하여 골절의 위험을 낮출 수 있을 뿐, 골절부위의 집합 및 골을 형성하지는 않았다. 이는 골다공증의 발생기전이 유전적 또는 체질적 요인으로 골의 음성평형상태가 지속되어 섬세한 골격의 자질을 가지는 상태, 골질이 정상속도로 흡수되지만 골의 형성이 부진한 상태 및 골이 정상속도로 형성되지만 골의 흡수가 증가된 상태이기 때문인 것으로, 이와 같이 골다공증과 골절은 발생기전이 전혀 달라 골다공증 치료제로 골절을 치료할 수 있다고 유추할 수 없다.

상기와 같은 골다공증과 골절의 기전 차이로 인하여 골의 재흡수(bone resorption)를 억제하여 골다공증 치료효과를 나타내는 약제는 골형성(bone formation)도 억제하여 오히려 골절 치료를 지연시킬 수 있는데, 예를 들어 비스포스포네이트 제제인 인카드로네이트 디소듐(incadronate disodium)을 장기간 연속적으로 투여하였을 경우 랫트의 대퇴골(femur)의 골절 치유를 지연시켰다는 보고가 있고(Li C et al., J. Bone Miner Res. 2001 Mar; 16(3):429-36), 인카드로네이트를 전처리했을 때 골절 후 16주에서 골절 치유에 영향을 미치지 않는 반면 계속적인 인카드로네이트 치료는 가골은 증가시키지만, 골절 치유동안 리모델링 과정을 지연시킨다는 보고도 있다(Li J et al., J. Bone Miner Res. 1999 Jun; 14(6):969-79).

또한, 골다공증과 깊은 관련이 있는 것으로 알려진 골생성 바이오 마커인 bFGF 등은 골절치유와는 아무런 관련이 없는 것으로 보고되고 있다(Xu 등, Chin. J. Traumatol. 6, 160~166, 2003).

따라서, 일반적인 골절 발생시 정상상태로의 치유를 효과적으로 촉진하기 위하여 골다공증 치료제를 사용하기에는 상기와 같은 이유로 한계가 있어서, 골다공증과 무관하게 고유한 골절 치유 효과를 갖는 약제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

이에 본 발명자들은 골절에 대한 효과적인 치료제를 개발하기 위하여 연구하던 중, 본 발명자들이 골다공증 치료제(대한민국특허 공개공보 제 10-2003-8654호)로 발명한 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 및 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘이 골다공증과 골절의 발생기전이 전혀 상이함에도 불구하고 골절 시 형성되는 가골의 골밀도 및 골강도를 증가시키며 가골내의 연골 및 결합조직의 골화를 촉진하여 골절 치유 촉진에 탁월한 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

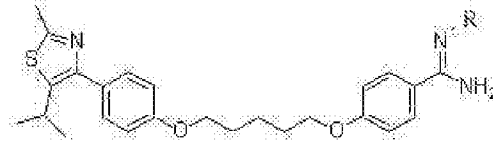
본 발명은 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘, 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 골절 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 조성물을 투여하여 골절을 치료하는 방법을 제공한다

발명의 구성 및 작용

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 벤즈아미딘 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 골절 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

화학식 1



(상기 화학식 1에서, R은 수소 또는 히드록시기이다.)

상기 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 당 분야의 통상적인 염의 형태로 사용할 수 있으며, 약제학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 바람직하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플루오로아세트산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 말레인산, 벤조산, 글루콘산, 글리콜산, 숙신산, 4-모폴린에탄설폰산, 캄포설폰산, 4-니트로벤젠설폰산, 히드록시-O-설폰산, 4-톨루엔설폰산, 칼록투론산, 엠보산, 글루탐산, 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

본 발명의 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 공지된 방법에 따라 제조하여 사용할 수 있다(이성은, Synthesis and Biological Activity of Natural Products and Designed New Hybrid Compounds for the Treatment of LTB₄ Related Disease, 부산대학교 대학원 이학박사 학위논문, 1999. 8).

본 발명에서 용어 "골절"은 뼈의 연속성이 완전 또는 불완전하게 소실된 상태로서, 해부학적인 부위(골단, 골간단, 골간부, 관절내, 또는 근위부, 간부, 원위부 등), 골절의 정도(완전, 불완전 등), 골절의 방향(횡상, 사상, 나선상, 종상 등), 개방창 동반유무(개방성, 폐쇄성), 골절편의 수(단순 또는 선상, 분쇄, 분절 등), 골절의 안정성(안정성, 불안정성), 골절편의 전위 유무 등을 기준으로 분류되는 다양한 골의 물리적 손상을 일컫는다.

본 발명의 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 무처리 대조군에 비해 가골의 체적을 유의성 있게 감소시키고 가골의 골밀도 및 골강도는 유의성 있게 증가시키며, 투여 용량이 많을수록 가골의 체적은 더 많이 감소하고 가골의 골밀도 및 골강도는 더 많이 증가한다($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$).

또한, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 무처리 대조군에 비해 가골 조직내 결합조직 및 연골조직의 함량을 유의성 있게 감소시키고 골조직 함량은 유의성 있게 증가시키며, 투여 용량이 많을수록 가골 조직내 결합조직 및 연골조직의 함량은 더 많이 감소하고 골조직의 함량은 더 많이 증가한다($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$).

또한, 골절 유발 초기의 경우 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 무처리 대조군에 비해 가골 조직내 파골세포의 수를 유의성 있게 증가시키며, 투여 용량이 많을수록 가골 조직내 파골세포의 수는 더 많이 증가한다($p < 0.01$).

또한, 골절 후기의 경우 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 무처리 대조군에 비해 가골 조직내 파골세포의 수를 유의성 있게 감소시킨다($p < 0.01$). 이는 이미 골화가 어느 정도 진행되었음을 나타낸다.

따라서, 본 발명의 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 골절시 형성된 가골의 소실 및 가골의 골화를 촉진시키며, 골절 초기에는 가골내 세포성분(cellular component)의 증가를 촉진시키고 골절 후기에는 골절시 형성된 가골의 골화를 촉진시킴으로써, 골절 치유 촉진제로 유용하게 사용할 수 있다.

본 발명의 조성물은 상기 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염에 추가하여 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 예를 들어 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 이들의 배합물 등을 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내, 국소 적용 등) 할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물이 약 10 내지 1,000mg/kg 이고, 바람직하게는 50 내지 500mg/kg 이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

본 발명의 조성물은 골절을 포함한 골의 물리적 손상의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

실시예 : 늑골골절을 유발시킨 랫트 모델에서 골절치유 촉진효과

화학식 1의 벤즈아미딘 화합물이 늑골골절 치유에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 인위적으로 늑골골절을 유발시킨 랫트에서 평가하였다. 상기 벤즈아미딘 화합물은 랫트의 늑골골절을 유발시킨 2일 후부터 1, 2, 3 및 4주간 투여하고, 체중 및 증체량의 변화, 형성된 가골의 체적, 골밀도, 골강도 및 조직학적 변화를 관찰하였다.

1. 실험동물 및 사양관리

80 마리의 S.D. 랫트(10주령, BioGenomics, Korea)를 12일간 실험실 환경에 순화시킨 후 본 실험에 사용하였다. 실험동물은 2 마리 또는 3 마리씩 랫트용 플라스틱 상자에 수용하여 온도(20 내지 25℃)와 습도(30 내지 35%)가 조절된 실험동물 사육실에서 사육하였다. 또한, 명암주기는 12시간 간격으로 조절하였으며, 사료와 수도수를 자유롭게 공급하였다.

2. 시료의 준비 및 투여

N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}벤즈아미딘 10mg 및 50mg을 무균 증류수 5ml에 완전히 녹여 용액상태의 시료를 실험동물에 투여하였다. 상기 벤즈아미딘 화합물을 수술 2일 후부터 매일 1회씩 1, 2, 3 및 4주간 각각 실험동물 체중 kg당 10mg 및 50mg씩 경구투여 하였다.

3. 늑골골절의 유발

모든 실험동물은 염산 케타민(ketamine)과 염산 자일라진(xylazine)으로 마취한 후 8번째 및 9번째 늑골을 수술용 가위를 이용하여 가로로 절단하여 골절을 유발하였다. 골절을 유발한 후, 골절부위가 잘 맞물리도록 짜 맞추는 후 일반적인 피부봉합을 통하여 창상을 폐쇄시켰다.

4. 체중 및 증체량의 변화

모든 실험동물의 체중을 수술 1일전, 수술일, 투여일, 투여 후 7, 14, 21 및 28일에 각각 측정하였다. 사료섭취에 따른 개체별 차이를 줄이기 위하여 체중 측정 전 모든 실험동물은 18시간이상 절식시켰다. 또한, 실험동물의 개체 차이에 의한 체중변화를 최소화하기 위하여, 각각 수술일로부터 투여 후 7, 14, 21 및 28일 동안의 체중 증가량인 증체량을 계산하였다.

결과는 표 1에 나타내었다.

[표 1]

실험군		증체량의 변화			
		수술일에서 투여 7일후	수술일에서 투여 14일후	수술일에서 투여 21일후	수술일에서 투여 28일후
대조군		18.80±12.07	40.20±25.07	63.40±15.68	71.60±15.82
화학식 1의	10mg/kg	16.00±13.55	44.40±14.54	46.40±22.39	61.20±22.81
벤즈아미딘 화합물	50mg/kg	14.80±08.81	36.82±29.52	68.60±16.65	84.40±23.37

표 1에 나타난 바와 같이, 모든 실험군에서 유의성 있는 증체량의 변화가 관찰되지 않아 실험물질의 투여 또는 실험동물의 개체 차이에 의한 오류는 거의 없는 것을 알 수 있다.

5. 가골의 체적

모든 실험동물은 최종 희생일에 골절을 유발시킨 8 및 9번째 늑골에 형성된 가골을 주위 조직과 잘 분리하여 적출하고, 적출된 늑골에서 형성된 가골의 장경과 단경을 mm 단위로 측정하였다. 측정된 가골의 장경과 단경을 이용하여 하기 수학식 1을 이용하여 가골의 체적을 측정하였다.

$$\text{가골의 체적} = 1/2 (a \times b^2)$$

a: 가골의 장경, b: 가골의 단경

결과는 표 2에 나타내었다.

[표 2]

실험군		가골의 체적 변화(mm ³)			
		투여 7일후	투여 14일후	투여 21일후	투여 28일후
대조군		35.35±7.96	19.09±3.11	11.69±4.15	9.25±3.00
화학식 1의	10mg/kg	12.84±4.42*	5.47±1.81*	4.73±2.13*	3.96±2.41*
벤즈아미딘 화합물	50mg/kg	8.62±3.43*	4.36±1.44*	3.84±1.86*	3.37±0.79*

*: 대조군과 비교하여 유의성 있음(p<0.01)

표 2에 나타난 바와 같이, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군에서 가골의 체적은 무처리 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, 투여 용량이 많을수록 가골의 체적은 더 많이 감소하였다(p<0.01).

따라서, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 골절시 형성된 가골의 소실을 촉진시킴을 알 수 있다.

6. 조직검사 및 분석

골절을 유발한 후 적출한 8번째 늑골을 10% 중성포르말린에 고정한 다음 탈회액(2.24% 포름산과 0.5N 수산화나트륨으로 구성된 용액)을 이용하여 탈회를 실시하였다. 이때 탈회액은 매일 1회씩 5일간 교환하였다. 탈회를 완료한 후 파라핀 포매를 실시하고 3 내지 4µm의 조직 절편을 제작한 다음 헤마토틀린-에오신(Hematoxylin-eosin) 또는 마손스 트리크롬(Masson's trichrome) 염색을 실시하고 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

결과는 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군에서 가골부위내의 골조직은 무처리 대조군에 비해 모든 투여기간에서 증가하였으며, 투여 용량이 많을수록 가골부위의 골조직이 더 많이 증가함을 관찰하였다.

따라서, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 골절시 형성된 가골에서 골 형성을 촉진시킴을 알 수 있다.

상기의 방법으로 제작된 늑골 조직표본을 이용하여, 가골조직내에 존재하는 결합조직, 연골 및 골조직의 양을 자동영상분석장치(Analysis Image processing; SIS Germany)를 이용하여 % 단위로 측정하였다.

결과는 표 3 내지 표 5에 나타내었다.

또한, 가골 특히 골절면에서 연골내 골화가 시작되는 $200\mu\text{m}^2$ 내에 존재하는 파골세포의 수를 자동영상분석장치를 이용하여 측정하였다.

결과는 표 6에 나타내었다.

[표 3]

실험군		가골 조직내 결합조직 함량의 변화(총 가골량에 대한 %)			
		투여 7일후	투여 14일후	투여 21일후	투여 28일후
대조군		51.34±11.55	19.43±2.01	15.10±2.96	7.14±2.73
화학식 1의 벤즈아미딘 화합물	10mg/kg	33.19±3.06	6.28±0.72*	5.55±1.42*	3.20±0.89*
	50mg/kg	29.51±5.70**	6.06±0.44*	3.58±0.62*	2.59±0.52*

* : 대조군과 비교하여 유의성 있음($p<0.01$),

** : 대조군과 비교하여 유의성 있음($p<0.05$)

표 3에 나타난 바와 같이, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군에서 가골 조직내 결합조직 함량은 무처리 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, 투여 용량이 많을수록 가골 조직내 결합조직의 함량은 더 많이 감소하였다($p<0.01$ 또는 $p<0.05$).

따라서, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 골절시 형성된 가골내에서 결합조직의 골조직으로의 대체 즉, 골화를 촉진시킴을 알 수 있다.

[표 4]

실험군		가골 조직내 연골조직 함량의 변화(총 가골량에 대한 %)			
		투여 7일후	투여 14일후	투여 21일후	투여 28일후
대조군		43.28±4.66	39.49±2.79	24.93±4.13	17.78±2.30
화학식 1의 벤즈아미딘 화합물	10mg/kg	24.79±5.43*	23.77±3.44*	18.51±2.29*	6.59±2.02*
	50mg/kg	22.42±5.45*	20.09±6.38*	11.49±2.31*	5.37±1.38*

* : 대조군과 비교하여 유의성 있음($p<0.01$)

표 4에 나타난 바와 같이, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군에서 가골 조직내 연골조직 함량은 무처치 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, 투여 용량이 많을수록 가골 조직내 연골조직의 함량은 더 많이 감소하였다($p<0.01$).

따라서, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 골절시 형성된 가골내에서 연골조직의 골조직으로의 대체 즉, 연골내 골화를 촉진시킴을 알 수 있다.

[표 5]

실험군		가골 조직내 골조직 함량의 변화(총 기골량에 대한 %)			
		투여 7일후	투여 14일후	투여 21일후	투여 28일후
대조군		1.92±0.70	38.21±4.92	54.49±6.04	66.88±5.68
화학식 1의 벤즈아미딘 화합물	10mg/kg	37.95±6.44*	54.31±9.50**	66.71±5.41**	83.30±4.43*
	50mg/kg	39.24±14.12*	55.94±8.38*	74.07±8.43*	87.27±8.97**

* : 대조군과 비교하여 유의성 있음($p<0.01$),

** : 대조군과 비교하여 유의성 있음($p<0.05$)

표 5에 나타난 바와 같이, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군에서 가골 조직내 골조직 함량은 무처치 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, 투여 용량이 많을수록 가골 조직내 골조직의 함량은 더 많이 증가하였다($p<0.01$ 또는 $p<0.05$).

따라서, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 골절시 형성된 가골의 골화를 촉진시킴을 알 수 있다.

[표 6]

실험군		가골 조직내 파골세포의 수적 변화 (가골 200 μm^2 내에 존재하는 수)			
		투여 7일후	투여 14일후	투여 21일후	투여 28일후
대조군		15.80±1.92	21.80±3.35	56.80±3.03	41.60±11.46
화학식 1의 벤즈아미딘 화합물	10mg/kg	43.80±3.83*	50.60±2.70*	31.00±6.67*	21.60±3.58*
	50mg/kg	42.60±4.62*	53.60±2.41*	22.20±3.03*	17.60±2.97*

* : 대조군과 비교하여 유의성 있음($p<0.01$),

표 6에 나타난 바와 같이, 골절 유발 초기의 경우 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군에서 가골 조직내 파골세포의 수는 무처치 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, 투여 용량이 많을수록 가골 조직내 파골세포의 수는 더 많이 증가하였다($p<0.01$). 따라서, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 골절 초기 가골내 세포성분의 증가를 촉진시킴을 알 수 있다.

또한, 골절 후기의 경우 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군에서 가골 조직내 파골세포의 수는 무처치 대조군에 비해 유의성 있게 감소되어($p<0.01$), 이미 골화가 어느 정도 진행되었음을 알 수 있다.

따라서, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 골절시 형성된 가골의 골화를 매우 효과적으로 촉진시킴으로, 골절 치유 촉진제로 유용하게 사용할 수 있다.

7. 가골 골밀도의 측정

골절을 유발한 후 적출한 9번째 늑골에서 가골이 형성된 부위의 골밀도를 이중 에너지 X선 흡광분석법(dual-energy x-ray absorptiometry; DEXA, PxiMus; Lunar Medison, WI)를 이용하여 mg/cm^3 의 단위로 측정하였다.

결과는 표 7에 나타내었다.

[표 7]

실험군		가골 골밀도의 변화(mg/cm^3)			
		투여 7일후	투여 14일후	투여 21일후	투여 28일후
대조군		0.12 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.28 ± 0.08	0.39 ± 0.07
화학식 1의	10mg/kg	$0.24 \pm 0.04^*$	$0.32 \pm 0.04^*$	$0.39 \pm 0.04^{**}$	$0.55 \pm 0.06^{**}$
벤즈아미딘 화합물	50mg/kg	$0.24 \pm 0.03^*$	$0.32 \pm 0.04^*$	$0.44 \pm 0.07^{**}$	$0.57 \pm 0.04^{**}$

* : 대조군과 비교하여 유의성 있음($p < 0.01$),

** : 대조군과 비교하여 유의성 있음($p < 0.05$)

표 7에 나타난 바와 같이, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군에서 가골 골밀도는 무처리 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, 투여 용량이 많을수록 가골 골밀도는 더 많이 증가하였다($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$).

따라서, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 골절시 형성된 가골에서 골 밀도의 증가를 촉진시킴을 알 수 있다.

8. 가골 골강도의 측정

골절을 유발한 후 적출한 9번째 늑골에서 가골이 형성된 골절면 부위의 골강도를 골강도 측정장치(Instron 6022; Instron, USA; speed 20mm/min)를 이용하여 tree-point bending 법으로 측정하였다.

결과는 표 8에 나타내었다.

[표 8]

실험군		가골 골강도의 변화(가한 충격의 횟수)			
		투여 7일후	투여 14일후	투여 21일후	투여 28일후
대조군		1.24 ± 0.28	1.53 ± 0.51	2.06 ± 0.18	2.38 ± 0.22
화학식 1의	10mg/kg	$2.15 \pm 0.42^{**}$	$2.57 \pm 0.65^*$	$3.10 \pm 0.40^*$	$3.26 \pm 0.43^{**}$
벤즈아미딘 화합물	50mg/kg	$2.35 \pm 0.47^{**}$	$2.84 \pm 0.34^*$	$3.23 \pm 0.35^*$	$3.35 \pm 0.38^{**}$

* : 대조군과 비교하여 유의성 있음($p < 0.01$),

** : 대조군과 비교하여 유의성 있음($p < 0.05$)

표 8에 나타난 바와 같이, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군에서 가골 골강도는 무처리 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, 투여 용량이 많을수록 가골 골강도는 더 많이 증가하였다($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$).

따라서, 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물은 골절시 형성된 가골에서 골 강도의 증가를 촉진시킴을 알 수 있다.

9. 통계처리

모든 수치는 평균±표준편차로 표시하였으며, 대조군과 비교하여 SPSS (Release 6.1.3., SPSS Inc., USA)를 이용하여 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum 법으로 유의성을 검증하였다.

또한, 마찬가지로, N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}벤즈아미딘의 메탄설폰산염 및 염산염, 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}벤즈아미딘 및 이의 메탄설폰산염 및 염산염도 상기한 바와 유사한 골절 치유 효과를 나타내었다.

제제예:

1. 산제의 제조

화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 - 2g

유당 - 0.5g

만니톨 - 0.5g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

2. 정제의 제조

화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 - 100mg

옥수수전분 - 50mg

미결정 셀룰로스 - 50mg

유 당 - 100mg

포비돈 - 15mg

스테아린산 마그네슘 - 2mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

3. 캡슐제의 제조

화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 - 100mg

옥수수전분 - 50mg

미결정 셀룰로스 - 50mg

유 당 - 100mg

포비돈 - 15mg

스테아린산 마그네슘 - 2mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

4. 연질캡슐의 제조

화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 - 100mg

콩기름 - 400mg

레시틴 - 20mg

젤라틴 - 200mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 연질캡슐제의 제조방법에 따라서 제조하였다.

5. 주사액제의 제조

화학식 1의 벤즈아미딘 화합물 - 10 μ g/ml

묾은 염산 BP - pH 3.5로 될 때까지

주사용 염화나트륨 BP - 최대 1ml

적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 화학식 1의 벤즈아미딘 화합물을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묾은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120℃에서 15분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다

발명의 효과

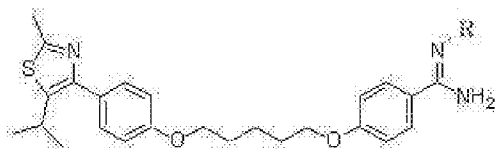
본 발명의 조성물은 가골의 체적을 유의성 있게 감소시키고, 가골의 골밀도 및 골강도를 유의성 있게 증가시키며, 가골 조직내 결합조직 및 연골조직의 함량을 유의성 있게 감소시키고, 골조직 함량을 유의성 있게 증가시킴으로, 골절시 형성된 가골의 소실 및 가골의 골화를 촉진시킨다. 따라서, 본 발명의 조성물은 골절에 대한 치유 촉진제로 유용하게 사용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기 화학식 1로 표시되는 벤즈아미딘 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 골절 치료용 약제학적 조성물.

화학식 1



(상기 화학식 1에서, R은 수소 또는 히드록시기이다)

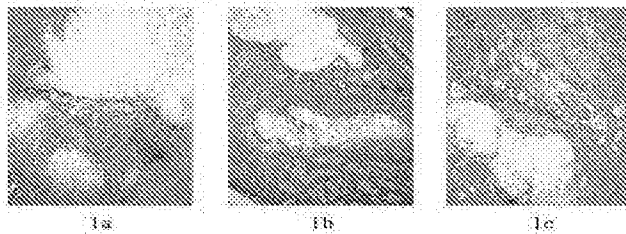
청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 염이 메탄설폰산염 또는 염산염인 조성물.

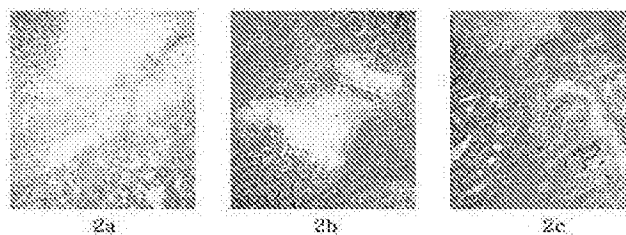
도면

도면1

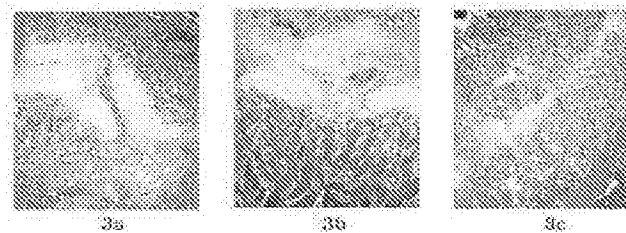
1. 골절 유발하고 약물투여 7일 후



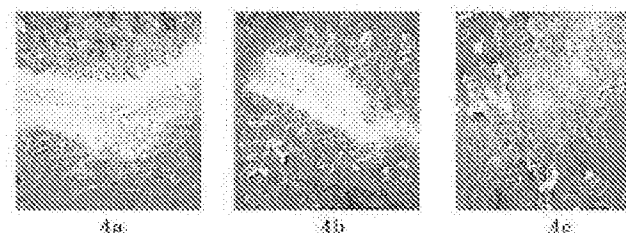
2. 골절 유발하고 약물투여 14일 후



3. 골절 유발하고 약물투여 21일 후



4. 골절 유발하고 약물투여 28일 후



a : 배제 대조군
b : 화학적 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군 (10mg/kg)
c : 화학적 1의 벤즈아미딘 화합물 투여군 (50mg/kg)